

卵黄 Vitellin に関する研究 (第2報)

Vitellin よりホスホセリンの分離および Vitellin 中の
ホスホセリン, セリン, プロリン, メチオニン含量について

安 福 英 子* 木 戸 詔 子*

Studies on the Vitellin of Yolk (Part 2)

Separation of Phosphoserine and Contents of Phosphoserine,
Serine, Proline and Methionine in Vitellin

Hideko Yasufuku Syoko Kido

I. 緒 言

第1報¹⁾で Vitellin 中のアミノ酸含量の定量を行なった際、アミノ酸自動分析器により50cmカラムで中酸性アミノ酸を分析した時、アスパラギン酸の前部にニンヒドリン反応(+), リン反応(+)²⁾の1つのピークを認めた。Rapoport³⁾も卵黄からとり出した Vitellenic acid を 2N-HCl で処理してバリウム塩沈殿よりセリンとリンの結合を証明しており、またカゼイン中のリンも、その $\frac{2}{3}$ はセリンと結合していると報告しているが、セリンとリン酸がエステル結合したホスホセリンの形では分離・定量されていないので、その分離を試みた。また Vitellin 中のリンがすべてセリンと結合しているとすれば理論上のホスホセリン含量は 2.8 g となりわれわれの得た結果よりかなりの差を生じる。したがって、ホスホセリンの定量については 6N-HCl では他のアミノ酸に比べて非常に分解されやすい性質のものであると考えられるので、ホスホセリンの定量法について検索し、理論値に近い値を得た。その他、外そう法より含量を算出していた、セリン、プロリン、メチオニンについても再検討を行なったので報告する。

II. 実験の部

II-I 実験方法

II-I-I Vitellin よりホスホセリンの分離

Vitellin 1g に 6N-HCl 100ml を加え、窒素ガスを

通じながら4時間加水分解を行なった後、減圧アルカリデシケーター中で HCl を除去して、黒褐色粉末を得た。これを蒸留水で溶解し、pH 1.5 に調整後 20ml に定容し濾過する。その 2ml を次に述べるカラム展開の試料とした。精製したアンバライト IR-45(200~400mesh) 10g を pH 3.0 の HCl で膨潤した後、カラム I (2×15cm) に充てんし、同 HCl で充分洗浄後、試料を添加、同HCl で展開し、溶出液がニンヒドリン反応(-)になるまで溶出する(樹脂上部に褐色リングが残存)。次に 0.1N-HCl で展開を行ない、5 g づつフラクションコレクターで分取し、ニンヒドリンとリンの反応が(+)の部分、F. C. No. 12~15 (褐色リング溶出)を集め減圧濃縮を行ない HCl を除去した。このカラム I 処理後の分画試料をアミノ酸自動分析で分析してみると、図2—①のごとくホスホセリン以外に主として酸性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸の小さなピークが混在するのが認められたので、さらにカラム II を使用して精製を行な

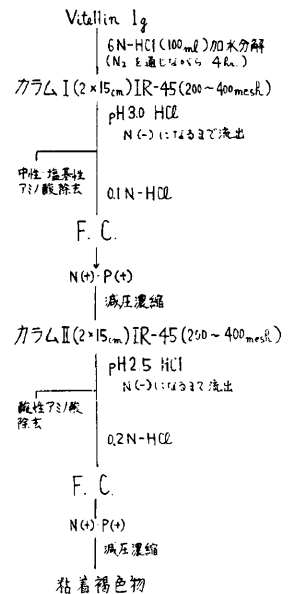


図1 ホスホセリンの分離

* 本学食品学研究室

った。

カラム I と同様、アンバライト IR-45 10g を pH2.5 の HCl 膨潤したものをカラム II に充てんし、蒸留水で洗浄後、カラム I 処理後の分画試料を pH 1.5 に調整した後吸着させ、pH 2.5 の HCl で展開し、溶出液のニンヒドリン反応が(-)になるまで溶出させる。カラム I と同様褐色リングがカラム上部に残存する。次に 0.2N-HCl で展開を行ない、フラクションコレクターで 5g ずつ分取して、ニンヒドリン反応(+), リン反応(+)³⁾の部分、F.C. No. 5, 6 を得、減圧濃縮して HCl を完全に除去して粘着褐色物質を得た。この分画物質は図 2—②のごとくアミノ酸自動分析器で分析した結

果ホスホセリン部に 1つのピークを認めた。

なおアミノ酸自動分析器で 50cm カラムを使用した場合、ホスホセリンもホスホスレオニンもほとんど同位置にピークを認めたので、次に述べるようにホスホセリン、ホスホスレオニンを対照として同定を行なった。

II—I—II ホスセリンの同定

1) 酸加水分解

標品のホスホセリン、ホスホスレオニンと分離した試料の混合試験をアミノ酸自動分析器で分析したが、いずれも 1つのピークしか得られなかった。またアミノ酸により 570m μ と 440m μ の吸光度の比が異なるのでホスホセリンとホスホスレオニンの吸光度比を比較検討したが、あまり差がなかった。

後述のごとく、6N-HCl でホスホセリンを 24 時間分解すればセリンに分解されることから、Vitellin より分離精製した粘着褐色物の一定量を 6N-HCl で減圧封管し、110°C で 24 時間分解を行なった後、HCl を除去しアミノ酸分析を行なった結果図 3—①のように、セリン部に 1つのピークを認めた。この酸分解液に標品のセリンおよびスレオニンを加え、混合試験を行なった結果図 3—②③のようにセリンと一致した。³⁾⁴⁾

2) 薄層クロマトグラフィー

一般のアミノ酸についての薄層クロマトグラフィーについては多くの文献が見られるが、リン酸とエステル結合したものについては少ない。標品のホスホセリン、ホスホスレオニンおよびセリン、スレオニンを対照として、シリカゲル G を用い蒸留水で吸着プレートを作り、種類の溶媒で展開したが、ホスホセリン、ホスホスレオニンは原点よりほとんど移動しない。そこで、リン化合物ではアルカリ吸着プレートを使用している場合が多いので、炭酸ナトリウムなどのアルカリ⁵⁾を混入して試みたが移動率が小さく、Mamgold らの

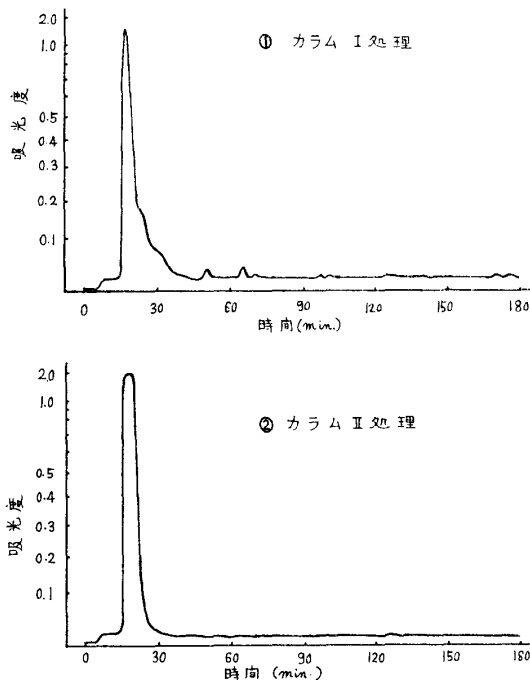


図 2 カラム処理後のホスホセリンクロマトグラフィー

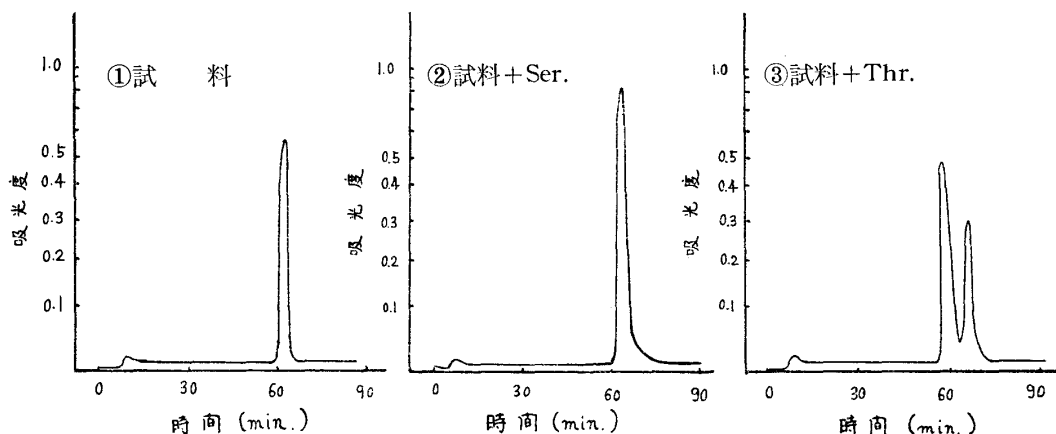


図 3 Vitellin の 24 時間酸分解のホスホセリンクロマトグラフィー

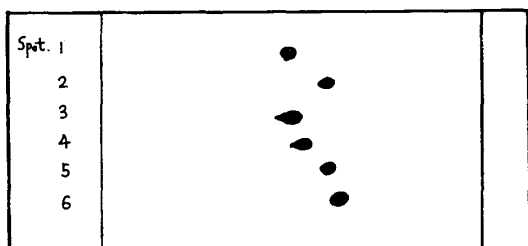
表1 アミノ酸の薄層クロマトグラフィ (Rf×100)

シリカゲル 吸着プレート溶媒	展 開 液	Rf 値			
		P-ser.	P-Thr.	Ser.	Thr.
10%硫酸 アンモニウム	クロロホルム・メタノール：水 (62：25：4)	67	59	68	68
	96%アルコール：水 (7：1)	30	34	55	55
5%硫酸 アンモニウム	プロパノール：ギ酸：水 (20：1：5)	2	3	5	
	クロロホルム・メタノール ((1：1))	2	3	8	
	96%アルコール：水 (7：1)	48	50	60	61
	96%アルコール：水 (7：3)	50	54	60	62
1%硫酸 アンモニウム	クロロホルム：メタノール：酢酸：水(25：15：4：2)	2	4	5	10
	96%アルコール：水 (7：1)	45	50	60	58

10%硫酸アンモニウムのシリカゲル吸着プレートを使用したところ。表1に示すような Rf 値を得た。そのうち5%の硫酸アンモニウムでシリカゲルGの吸着プレートを使用し、96%アルコール：水(7：3)の溶媒で展開したものが、ホスホセリン、ホスホスレオニンおよびセリン、スレオニンを対照として行なう場合、最も適していると考えられる。

Vitellin より分離したホスホセリンを試料(1) そのホスホセリンの24時間酸分解物を試料(2)とし下記のごとく薄層クロマトグラフィによる同定を行なった。

吸着プレート：シリカゲルG 30gに5%硫酸アンモニウム溶液 60mlを加え、0.25mmの吸着プレートを作り110°Cで1時間乾燥し、30分以上放置したものを用いた。



原点
Spot 1. 試料(1) 2. 試料(2) 3. P-Ser.
4. P-Thr. 5. Ser. 6. Thr.

図4 アミノ酸の薄層クロマトグラフィ

展開溶媒・温度・時間：96%アルコール：水(7：3)，室温，2時間

呈色：0.3gのニンヒドリンを100ml n-ブタノールと3ml酢酸に溶解したものを噴霧し、110°Cで10分間加熱。

結果：試料(1)Rf=0.50, 試料(2)Rf=0.60

3) 沪紙電気泳動

Vitellin より分離したホスホセリンを試料として水平、液体冷却高圧泳動装置を使用して、次に示す条件で行なった。

緩衝液：酢酸：ギ酸：水=15：5：80(pH1.9)

沪紙：東洋沪紙 No. 51 (2×20cm)，正極より5cmの位置を原線とする。

泳動：75v/cm, 90分

呈色：0.2%ニンヒドリン水飽和ブタノール溶液を噴霧し100°C，5分加熱

移動度：0.7cm

なお、標品のホスホセリン、ホスホスレオニンを対

表2 アミノ酸の沪紙電気泳動の移動距離 (cm)

アミノ酸	pH 1.9	75v/cm	90分
試料			0.7
P-Ser.			0.7
P-Thr.			1.9

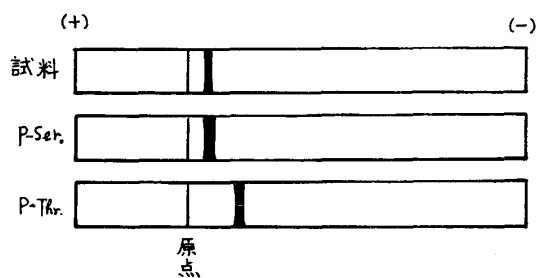


図5 アミノの酸紙電気泳動

照として行ない表2, 図5に示す結果を得た。

II-I-II Vitellin 中のホスセリンの定量

1) 標品のホスホセリン, ホスホスレオニンの酸分解による残存率

ホスホセリンもホスホスレオニンも50cmカラムを使用したアミノ酸分析器によるクロマトグラムは, ほぼ同じ位置にピークを認める。そこで両者について6N-HClを標品に対し200倍量加え封管して110°Cで分解し時間経過によるホスセリン, ホスホスレオニンの残存

表3 ホスホセリン, ホスホスレオニンの酸分解による残存率

分解時間 (hrr.)	P-Ser		P-Thr.	
	P-Ser	Ser	P-Thr	Thr
0	100	0	100	0
1/2			92.4	—
1	79.1	10.6		
2			100.4	3.0
4	41.5	29.7		
6	32.4	47.6	90.5	16.2
8	18.7	44.6	67.2	21.7
12	5.9	49.3		
18	1.6	52.5		
24	0			

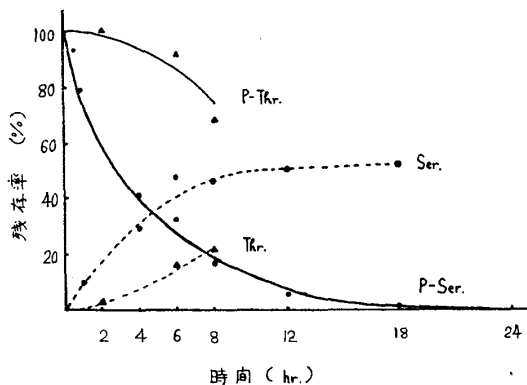


図6 ホスホセリン, ホスホスレオニンの酸分解による残存率

表4 Vitellin 中の酸分解によるアミノ酸の変化

分解時間	(μmol/g Vitellin)			
	P-Ser.	Ser.	Pro.	Met.
1/2	164	245	111	110
2	180			
3	177	527	241	123
4	209	758	311	173
5	175	703	359	135
6	97			
8	93	865	429	224

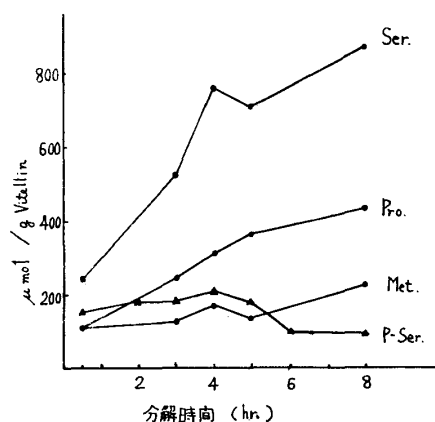


図7 Vitellin 中の酸分解によるアミノ酸の変化

率を検討し, 表3, 図6に示す結果を得た。

2) Vitellin 中のホスホセリンの弱酸および短時間による分解

ホスホセリンは 6N-HCl では不安定なことから, Vitellin を 1N, 2N, 3N, 4N-HCl で分解して定量したがあまり回収率はよくなかった。そこで6N-HClで第7図のごとく, 8時間までの分解状態を検討し4時間で最高値を得た。

以上の結果より Vitellin 中のホスホセリンは, 6N-HCl で4時間加水分解を行なった定量値より Vitellin 100g 中のアミノ酸残基に対するg数を算出すると2.6gとなった。

II-I-III Vitellin 中のセリン, プロリン, メチオニンの定量

ホスホセリンの定量と同様, 6N-HCl で8時間までの分解による変化を検討し図7のような結果を得, 8時間で最高値を得た。

II-II 実験結果および考察

(1) Vitellin よりホスホセリンをアンブライト IR-45 を使用し分離精製を行ない粘着褐色物を得, その性状をアミノ酸自動分析器や, 薄層クロマトグラフィー,

電気泳動により実験した結果、ホスホセリンであることを認めた。結晶化を試みたが、微量成分である上に、セリンとリンが分離しやすく、結晶化には至らなかった。

(2)第1報¹⁾で得たホスホセリンの含量が理論値とかなりの差を認めるのでホスホセリンの定量法について検討を行なった結果、表3のようにホスホスレオニンは6N-HClと加熱した場合、8時間ではその残存率が67.2%と比較的安定なのに対し、ホスホセリンは18.7%となっていることから6N-HClでVitellinを定量する場合、短時間によらなければならないことが判明し、Vitellin中のホスホセリンは4時間で最高値を得、その結果ホスホセリン含量は2.6gとなった。この値は理論値2.8gより低い値となるが、セリンと同様ホスホセリンは酸と加熱することにより非常に分解されやすいので、10%増の補正を加えると、2.86gとなり理論値に近い値が得られる。

(3)ホスホセリンの他、第1報で外そう法によりアミノ酸含量を算出したセリン、プロリン、メチオニンについても、6N-HClで短時間による分解を検討してみたが、いずれも8時間の分析値の方が高いと考えられ

る。したがってセリンについては8時間の値に補正を加えた8.4gとする方がよいのではないかと考える。他のアミノ酸については、8時間の値をとれば、Vitellin中のプロリン4.2g、メチオニン2.8gとなり、シスチンの場合も8時間の値から算出すれば1.1gとなる。

以上の結果より第1報で得たVitellin中のアミノ酸含量を再検討することにより、第1報のアミノ酸の中、ホスホセリンを4時間の分析値に約10%の補正を加え、2.8gとすると、全アミノ酸の回収率は100.1%となる。さらにセリンを8時間の値に10%補正を加え、8.4gとすると99.7%となり、シスチン、プロリン、メチオニン含量を外そう法によらず8時間の値をとれば99.1%となり、よい回収率が得られた。

III. 要 約

(1)Vitellinよりセリンとリンのエステル結合したホスホセリンを分離した。

(2)Vitellinを短時間で酸分解することにより、4時間の分解値に10%補正を加え、理論値に近いホスホセリン含量を得た。

(3)セリン、プロリン、メチオニンについても短時間による酸分解による変化を検討した結果、セリンについては8時間の分解値に10%補正した値をとる方がよいものとする。またシスチン、メチオニンについては外そう法によらず8時間の値をとる方がよいとする。

以上のように卵黄Vitellinを酸分解時間による各アミノ酸含量をアミノ酸自動分析器により定量を行ない、Vitellinのアミノ酸組成を検索し、表5に示すように99~100%の回収率を得た。

本研究に対し御指導、御配慮をたまわりました本学名誉教授工藤豊先生に深謝します。

参 考 文 献

- 1) 安福, 木戸, 本誌, 26. 27 (1971)
- 2) S. Rapoport, Biochem Z., 289, 420 (1963~1937)
- 3) E. S. Perry, A. Weissberger, Technique of Organic Chemistry, 12, 309, 438 (1967)
- 4) Kurt Randerath, Thin-Layer Chromatography., 110, 159, 170 (1966)
- 5) H. K. Mangold, R. Kammereck, J. Am. Oil Chemist's Soc., 39, 201 (1962)
- 6) 電気泳動学会, 電気泳動実験法, 175 (1967)

表5 Vitellinのアミノ酸組成
(g/100g Vitellin)

アミノ酸	たんぱく質100g中アミノ酸残基に対するg数
Try.	1.2
Lys.	8.5
His.	2.9
Arg.	8.9
P-Ser.	2.8
Asp.	8.6
Thr.	4.1
Ser.	8.4
Glu.	10.2
Pro.	4.2 (4.2)
Gly.	2.4
Ala.	4.4
Cys.	1.3 (1.1)
Val.	5.3
Met.	3.2 (2.8)
Ileu.	5.9
Leu.	8.6
Tyr.	4.4
Phe.	4.4
合計	99.7 (99.1)

()は8時間酸分解値をとった場合